

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年11月28日
Date of Application:

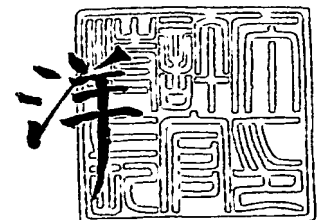
出願番号 特願2003-399016
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-399016]

出願人 株式会社プライミューン
Applicant(s): 日本医薬品工業株式会社

2005年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 DA-03588
【提出日】 平成15年11月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/83
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 3 - 9 横浜市立大学内
 【氏名】 島田 勝
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 3 - 9 横浜市立大学内
 【氏名】 奥田 研爾
【特許出願人】
 【識別番号】 501069599
 【氏名又は名称】 株式会社 プライミューン
【特許出願人】
 【識別番号】 592073695
 【氏名又は名称】 日本医薬品工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100066692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 皓
【選任した代理人】
 【識別番号】 100072040
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 肇
【選任した代理人】
 【識別番号】 100088926
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長沼 暉夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100102897
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 池田 幸弘
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 002901
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルスのエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれており、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されているキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクター

。

【請求項 2】

請求項 1 のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターを有効成分とする医薬組成物。

【請求項 3】

抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御用である請求項 2 の医薬組成物。

【請求項 4】

ヒト免疫不全ウイルス用ワクチンである請求項 2 または 3 の医薬組成物。

【請求項 5】

ヒト免疫不全ウイルスのエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターとともに用いるための請求項 2 から 4 のいずれかの医薬組成物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御用キメラ 5 型/35 型 アデノウイルスベクター

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御用キメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターに関する。更に詳細には、本発明は、非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロープ蛋白をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれ、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子に発現可能なように置換されてなるキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターおよびそれを用いた抗 HIV 感染防御用医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) は、HIV 感染患者の死亡率減少にめざましい効果を発揮している。しかしながら、HAART には副作用と抵抗性の発生率が高いという問題点があり、発展途上国においてはその治療薬の入手が困難であるのが現状である。さらに、HAART には HIV 感染の予防薬としての効果はなく、これからの AIDS 対策において、安全性かつ有効性の高いワクチンの開発は非常に重要な課題であると言える。

HIV 感染に対する防御機構において、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が中和抗体以上に重要な役割を果たしているという報告が数多くなされている (非特許文献 1、非特許文献 2 および非特許文献 3)。そのため過去 10 年間、細胞性免疫を増強することを目的とした多様なワクチンが開発されてきた。HIV サブユニットペプチドワクチン、DNA ワクチン、組換えウイルスベクターワクチン (組換えワクチニアウイルス Ankara 株 (rMVA)) (非特許文献 3 および非特許文献 4)、アデノウイルス (非特許文献 5)、狂犬病ウイルス (非特許文献 6)、フラビウイルス (非特許文献 7)、friend マウス白血病ウイルス (非特許文献 8)、ベネズエラ馬脳炎ウイルス (非特許文献 9)、水胞性口炎ウイルス (非特許文献 10)、アデノ随伴ウイルス (非特許文献 11 および非特許文献 12)、細菌ベクターワクチン (bacille Calmette-Guerin) (非特許文献 13)、乳酸菌 (非特許文献 14) などである。これらのワクチンは、単独あるいは複合で用いることによってウイルスに対する防御効果を示し、さらにこれらのうちいくつかはヒト以外の霊長類でのウイルス感染実験において AIDS の進行を食い止めることが報告されている (非特許文献 3、非特許文献 4、非特許文献 5、非特許文献 8、非特許文献 15 および非特許文献 16)。DNA で初回免疫を行い rMVA で追加免疫を行う複合型ワクチンは、もっとも成果をあげている方法のひとつであり、現在フェーズ I 臨床試験が行われている。

【0003】

ウイルスベクターとして期待されている 5 型アデノウイルス (Ad5) は rMVA よりも強い免疫原性を持っており (非特許文献 5)、ウイルス力価が高いという利点をはじめ、DNA 配列など生物学的特徴についてもよく研究されている。しかしながら、Ad5 は肝細胞に対する親和性が非常に高く (非特許文献 17)、オルニチン・トランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症の治療のために Ad5 ベクターを投与した患者が死亡した例も報告されており (非特許文献 18)、臨床治療用ベクターとしては使用が制限されている。

アデノウイルスには 49 の血清型があり、これらは 6 つの亜属 (A から F) に分類される。現在アデノウイルスベクターによる遺伝子導入系のほとんどは、2 型あるいは 5 型アデノウイルス (Ad2、Ad5 とともに C に属する) を用いている。なぜなら、Ad2 および Ad5 はもっともよく研究されており、DNA 配列まで明らかになっているためである (非特許文献 19 および非特許文献 20)。これまでの研究から、3 型アデノウイルス (Ad3)、35 型アデノウイルス (Ad35) (非特許文献 21 および非特許文献 22) 以外のアデノウイルスのほとんどは (非特許文献 7、非特許文献 9、非特許文献 13、非特許文献 15、非特許文献 22、非特許文献 23、非特許文献 24、非特許文献 25、非特許文献 26)、

coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) に結合することが知られている。CAR は、ヒトにおいて心臓、脾臓、中枢・末梢神経系、前立腺、睾丸、肺、肝臓、腸に発現しており、そのため Ad5 はヒトおよび動物において幅広い器官に感染すると考えられている。

【0004】

Ad5 を利用したワクチンとして、DNAワクチンによる初回免疫、Ad5 ベクターによる追加免疫を行う複合型ワクチンは、サルを用いた SHIV 感染実験においてめざましい感染防御効果を示すことが報告されている（非特許文献 27）。しかしながら、Ad5 は肝細胞に対する親和性が非常に高いために、ウイルスベクターワクチンとしての安全性が懸念されている。

【非特許文献 1】 Haynes, B. F. et al., Science 271:324-328, 1996

【非特許文献 2】 Miedema, F. et al., Science 272:505-506, 1996

【非特許文献 3】 Robinson, H. et al., Nat. Med. 5:526-534, 1999

【非特許文献 4】 Amara, R. R. et al., Science 292:69-74, 2001

【非特許文献 5】 Shiver, J. W. et al., Nature 415:331-335, 2002

【非特許文献 6】 Schnell, M. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3544-3549, 2000

【非特許文献 7】 Mandl, C. W. et al., Nat. Med. 4:1438-1440, 1998

【非特許文献 8】 Matano, T. et al., Vaccine 18:3310-3318, 2000

【非特許文献 9】 Caley, I. J. et al., Vaccine 17:3124-3135, 1999

【非特許文献 10】 Rose, N. F. et al., Cell 106:539-549, 2001

【非特許文献 11】 Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 13:1571-1581, 2002

【非特許文献 12】 Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 12:1047-1061, 2001

【非特許文献 13】 Aldovini, A. et al., Nature 351:479-482, 1991

【非特許文献 14】 Xin, K.-Q. et al., Blood 102:223-228, 2003

【非特許文献 15】 Barouch, D. H. et al., J. Virol. 75:5151-5158, 2001

【非特許文献 16】 Barouch, D. H. et al., Science 290:486-495, 2000

【非特許文献 17】 Adams, J. Y. et al., Nat. Med. 8:891-896, 2002

【非特許文献 18】 Thomas, C. E. et al., Nat. Reviews Genetics 4:346-358, 2003

【非特許文献 19】 Chroboczek, J. et al., Virol. 186:280-285, 1992

【非特許文献 20】 van Ormondt, H. et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110:73-142, 1984

【非特許文献 21】 Shayakhmetov, D. M. et al., J. Virol. 74:2567-2583, 2000

【非特許文献 22】 Stevenson, S. C. et al., J. Virol. 69:2850-2857, 1995

【非特許文献 23】 Amara, R. R. et al., J. Virol. 76:7625-7631, 2002

【非特許文献 24】 Farina, S. F. et al., J. Virol. 75:11603-13, 2001

【非特許文献 25】 Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609-617, 2003

【非特許文献 26】 Lieber, A. et al., J. Virol. 70:8944-8960, 1996

【非特許文献 27】 Lubeck, M.D. et al., Cell 106:539-549, 1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、より安全性が高く、かつ有効性の高い HIV ワクチンとして利用可能な Ad5 を用いた新たなウイルスベクターを提供することにある。更には、該ウイルスベクターを有効成分とする医薬組成物であって、抗 HIV 感染防御用、HIV ワクチン用、複合型ワクチン用に用いる医薬組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、より安全性が高く、かつ有効性の高い HIV ワクチンの開発を目指して鋭意研究を進めた。そこで、HIV 遺伝子を発現し、Ad35 ファイバーを持つ Ad5 キメラベ

クターを作製した。このキメラベクターの誘導する抗原特異的免疫反応を BALB/c マウスを用いて試験したところ、キメラベクターの筋注投与により、同力価の組換えワクチニアウイルス (Ankara 株) ベクターや増殖型組換えワクチニアウイルス (WR 株) ベクターに比べて、非常に強い HIV 特異的な細胞性免疫反応が惹起されることが明らかになった。さらに、DNA ワクチンによる初回免疫、このキメラベクターによる追加免疫は、追加免疫後 7 週間目において、HIV 遺伝子を発現するワクチニアウイルスの感染を完全に防いだ。この知見は、DNA ワクチンおよびこのキメラベクターを用いた複合型ワクチンが、AIDS の蔓延を抑制する画期的なワクチンになりうることを示唆している。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

【0007】

従って、本発明は、非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルスのエンベロップ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれており、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバーをコードする遺伝子が、35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されているキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターに関する。

更に本発明は、上記キメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターを有効成分とする医薬組成物に関する。この医薬組成物は、抗ヒト免疫不全ウイルス感染防御に、更には抗ヒト免疫不全ウイルス用ワクチンに用いることができる。また、抗ヒト免疫不全ウイルス遺伝子が発現可能なように組み込まれた非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターとともに用いる複合型ワクチンとして利用できる。

【発明の効果】

【0008】

本発明で提供されるキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、強い抗原特異的細胞性免疫反応を惹起することができる。これは現在抗ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ワクチンとして最有力視されている MVA ベクター以上に強い免疫反応である。さらに、マウスモデルにおいて、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターと DNA ワクチンを組み合わせた複合型ワクチンが、ウイルス感染に対する長期的な防御反応を誘導することもできる。従って、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、AIDS の蔓延を抑制する画期的な HIV ワクチンの開発の可能性を示唆している。更には、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に置換されているため、肝臓に対する毒性が軽減され樹状細胞への親和性が向上したものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、非増殖型 5 型アデノウイルスに、HIV のエンベロップ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれ、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されたものである。

本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターを構築するために用いる非増殖型 5 型アデノウイルスとしては、初期遺伝子 E1 が除去された 5 型アデノウイルスが好ましい。HIV のエンベロップ蛋白 (env) としては、HIV 1 型、HIV 2 型などのいずれのタイプの HIV のエンベロップ蛋白であってもよい。エンベロップ蛋白をコードする遺伝子およびそのアミノ酸配列は周知であり、Jounai, N. et al., J. Gene Med., 5:609-617, 2003; MacGregor RR et al., AIDS, 2002 Nov. 8;16(16):2137-2143; Chada, S. et al., J. Virol. 67:3409-3417, 1993; Ulrike, H. M. et al., AIDS, 9:43-50, 1995などに記載されており、またジーンバンクから遺伝子情報 Gene Bank No. 03455 として入手可能である。本発明では、エンベロップ蛋白をコードする遺伝子に限られず、エンベロップ蛋白と同様の免疫原性を有するその変異体をコードする遺伝子であってもよい。このような

変異体としては、エンベロープ蛋白のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛋白であってエンベロープ蛋白と同様の免疫原性を有する蛋白が挙げられる。また、エンベロープ蛋白をコードする遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、エンベロープ蛋白と同様の免疫原性を有する蛋白をコードする遺伝子でもよい。ストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子としては、例えば、 $6 \times \text{SSPE}$ 、 $2 \times \text{デンハルト溶液}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 0.1 mg/ml サケ精巢 DNA を含む溶液中で 65°C 、12 時間反応させる、という条件下でサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、ハイブリダイズする遺伝子などが挙げられる。

【0010】

エンベロープ蛋白またはこれらの変異体をコードする遺伝子は、周知の遺伝子情報に基づいて PCR 法等を利用する周知の方法により得ることができる。これらの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。また、上記した変異体をコードする遺伝子あるいはストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子は、例えば部位特異的突然変異誘発法、通常ハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には上記 Molecular Cloning 等の基本書を参考にして行うことができる。

本発明では、HIV のエンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子と共に HIV の調節遺伝子である rev 遺伝子 (Jounai, N. et al., J. Gene Med., 5:609-617, 2003; MacGregor RR et al., AIDS, 2002 Nov. 8;16(16):2137-2143; Chada, S. et al., J. Virol. 67:3409-3417, 1993; Ulrike, H. M. et al., AIDS, 9:43-50, 1995; Kowolik C M et al., Mol. Ther. 2003 Aug;8(2):324-3231; Zhang MJ. et al., J. Biomed. Sci. 1997 Nov-Dec;4(6):289-295; Gene Bank No. K03455) を用いてもよい。

これらの HIV のエンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子を必要に応じて rev 遺伝子と共に、発現可能なように非増殖型 5 型アデノウイルスに組み込むには、例えば、CMA プロモーター (サイトメガロウイルスプロモーター)、CAG プロモーター (CMA プロモーターとニワトリ β アクチンプロモーターのキメラプロモーター) の下流に rev 遺伝子、エンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子、次いでポリ A 遺伝子からなる発現ユニットの両端に 5 型アデノウイルスと同じ遺伝子を接続し、ヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞中で相同組換えにより導入することにより行うことができる。

【0011】

本発明で用いる 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子およびそのアミノ酸配列は既に公知であり、Mei, Y.F. et al., Virology 206 (1), 686-689, 1995; Dmitry M. et al., J. Virology, Mar. 2000, 2567-2583; NCBI U10272; NCBI AAA66361.1 などに記載されている。ファイバー蛋白は、shaft と knob から構成され、本発明では通常これらから構成されるファイバー蛋白をコードする遺伝子を用いる。本発明では、ファイバー蛋白をコードする遺伝子に限られず、ファイバー蛋白と同様の標的細胞への接着性を有するその変異体をコードする遺伝子であってもよい。このような変異体としては、ファイバー蛋白のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなる蛋白であってファイバー蛋白と同様の標的細胞への接着性を有する蛋白が挙げられる。また、ファイバー蛋白をコードする遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、ファイバー蛋白と同様の標的細胞への接着性を有する蛋白をコードする遺伝子でもよい。ストリンジェントな条件としては、例えば、上記した HIV のエンベロープ蛋白の場合と同様の条件などが挙げられる。

ファイバー蛋白またはこれらの変異体をコードする遺伝子は、エンベロープ蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子の場合と同様に、上記した既に周知の方法により容易に得ることができる。

これらの 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子を、非増殖型 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子と置換し、発

現可能なように非増殖型 5 型アデノウイルスに組み込むには、例えば、35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはその変異体をコードする遺伝子の両端に 5 型アデノウイルスと同様の遺伝子を接続してヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞中で相同組換えにより導入することができる。

【0012】

また、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、以下に説明するように、市販されているキットを用いて容易に構築することもできる。

即ち、例えば、E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子が発現可能なように導入され、かつ該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に発現可能なように置換された本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA) のキットを用いて容易に作製することができる。より詳細には、例えば、CAG プロモーター、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子並びにポリ A 遺伝子を有する遺伝子断片 (CAG promotor-HIV IIIB rev/env-polyA) を、Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609-617, 2003 に記載された pCAGrev/env から 5.2k bp Sal I/Pst I 断片として単離する。Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA) のキットには、Left handshuttle plasmid として、5 型アデノウイルス (Ad5) の 22-342 部位および Ad5 3523-5790 部位を相同組換え用に有し、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドベクター pLHSP と、Right hand shuttle plasmid として、E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子 (Ad35 shaft と Ad35 knob) に発現可能なように置換されたキメラプラスミドベクター Ad5/Ad35 が含まれている。

【0013】

まず、Ad5 22-342 部位、Ad5 3523-5790 部位、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミド pLHSP に、CAG promotor-HIV IIIB rev/env-polyA を有する 5.2k bp Sal I/Pst I 断片が導入された pLHSP-HIV シャトルプラスミドを作製するために、この 5.2kbp 断片を プラスミドベクター pLHSP のマルチクローニングサイトの一つである EcoRI サイトに挿入する。次いで、得られた pLHSP-HIV シャトルプラスミドは Pac I で切断して直鎖状にした後に、キメラプラスミドベクター Ad5/Ad35 とともに、Adenovirus generation kit (Avior Therapeutics) (Shayakhmetov, D. M. et al., J. Virol. 74:2567-2583, 2000) を用いてリン酸カルシウム法で HEK 293 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション後 7 から 10 日間、プレート培地でプラークを培養することにより、目的とする本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルス (Ad5/F35-HIV) を得ることができる。

このような方法により、他の本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターも同様に作製することができる。

【0014】

本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、非常に強い HIV 特異的細胞性免疫反応を惹起することができる。更には、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に置換されているため、肝臓に対する毒性が軽減され樹状細胞への親和性が向上したものである。

従って、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、HIV 感染防御用の医薬品として、また HIV ワクチンとして極めて有効である。また、HIV のエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれた通常の非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターと共に用いることによって、一段とその強い HIV 特異的細胞性免疫反応を惹起することができるため、これらの通常の非増殖型ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターと共に用いる複合型の HIV 用ワクチンとして極めて有効である。

これらの非増殖型ウイルスベクターとしては、例えば、2 型もしくは 5 型アデノウイ

ルスの初期遺伝子 E1 を HIV のエンベロープ蛋白を発現する遺伝子ユニットで置換した組換えアデノウイルス、あるいはワクチニアウイルスに HIV のエンベロープ蛋白を発現する遺伝子ユニットを導入した非増殖型組換えワクチニアウイルスなどが挙げられる。非ウイルスベクターとしては、哺乳動物細胞用に通常用いられる pCAGGS (Gene 108: 193-200, 1991)、pBK-CMV、pcDNA3.1、pZeoSV (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現用ベクターに、HIV のエンベロープ蛋白を発現する遺伝子ユニットを導入した非ウイルスベクターなどが挙げられる。

【0015】

本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターをヒトへ投与する方法としては、以下に記載する方法が挙げられる。

即ち、例えば、本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターを適当な溶剤、例えば、PBS 等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填して注射剤を調製して、ヒトへ注射することにより投与される。注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えてもよい。本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、静脈、筋肉、腹腔、皮膚等に投与することができる。

本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターの投与量は、投与する対象、投与方法、投与形態等によって異なるが、通常成人 1 人当たり $10^9 \sim 10^{13}$ ウイルス粒子数の範囲、好ましくは $10^{11} \sim 10^{12}$ ウイルス粒子数の範囲である。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例 1】

【0016】

(1) 本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターの構築

E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子が発現可能なように導入され、かつ該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に発現可能なように置換された本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターを、以下に記載するように、Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA) のキットを用いて作製した。

CAG プロモーター、HIV IIIB の rev 遺伝子および env 遺伝子並びにポリ A 遺伝子を有する遺伝子断片 (CAG promoter-HIV IIIB rev/env-polyA) は、Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609-617, 2003 に記載された pCAG rev/env から 5.2k bp Sal I/Pst I 断片として単離することにより得た。

Avior Therapeutics, Inc (Seattle, WA) から購入したキットには、Left hand shuttle plasmid として、Ad5 22-342 部位、Ad5 3523-5790 部位、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドベクター pLHSP と、Right hand shuttle plasmid として、E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子 (Ad35 shaft と Ad35 knob) に発現可能なように置換されたキメラプラスミドベクター Ad5/Ad35 が含まれている。

【0017】

まず、Ad5 22-342 部位、Ad5 3523-5790 部位、E. coli ori、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミド pLHSP に、CAG promoter-HIV IIIB rev/env-polyA を有する 5.2k bp Sal I/Pst I 断片が導入された pLHSP-HIV シャトルプラスミドを作製するために、この 5.2kbp 断片を プラスミドベクター pLHSP のマルチクローニングサイトの一つである EcoRI サイトに挿入した。次いで、得られた pLHSP-HIV シャトルプラスミドは Pac I で直鎖状にした後に、キメラプラスミドベクター Ad5/Ad35 とともに、Adenovirus generation kit (Avior Therapeutics) (Shayakhmetov, D. M. et al., J. Virol. 74:2567-2583, 2000) を用いてリン酸カルシウム法で HEK 293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後 7 から 10 日間、プレート培地でプラークを培養した。

目的とする本発明のキメラ 5 型/35 型アデノウイルス (Ad5/F35-HIV) は HEK 293 細胞

胞内で増殖させ、Lieber, A. et al, J. Virol. 70:8944-8960, 1996 で示されている CsC1 精製法で 2 回精製して得た。

【0018】

(2) その他の組換えベクター

以後の実験に用いた組換えベクターは以下に示すようにして入手した。

HIV env を発現する非増殖型ワクチニアウイルス (Ankara strain, MVA-HIV) (Amara, R. R. et al., Science 292:69-74, 2001; Amara, R. R. et al., J. Virol. 76:7625-7631, 2002; Robinson, H. et al., Nat. Med. 5:526-534, 1999) は、Dr. Moss (Laboratory of Viral Diseases, National Institutes of Health, MD) から提供された。HIV env を発現する増殖型ワクチニアウイルス (WR strain, vPE16) は、AIDS Reagent Program, National Institutes of Health, MD (Cat. No. 362) から購入した。これらの組換えワクチニアウイルスは、それぞれ初代培養チキンペロ細胞と CV1 細胞で増殖させた。

【0019】

E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルスに、Green fluorescent protein (GFP) をコードする遺伝子が発現可能なように導入され、かつ該 5 型アデノウイルスのファイバー遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー遺伝子に発現可能なように置換されたキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクター (Ad5/F35-GFP) (Jounai, N. et al., J. Gene Med. 5:609-617, 2003) とガラクトシダーゼ Z (LacZ) を発現する E1 欠損非増殖型 5 型アデノウイルス (Ad5-LacZ)、キメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクター (Ad5/F35-LacZ) についてはすでに報告されている (Mizuguchi, H. et al., Gene 285:69-77, 2002)。

組換えウイルスの力価はスペクトロフォトメーターで測定し、 $1 \text{ OD}_{260} = 10^{12}$ particles $= 10^{10}$ plaque forming unit (PFU) として算出した。HIV IIIB rev および env 遺伝子を持つ DNA ワクチン (pCAG rev/env) についてはすでに報告されている (Jounai, N. J. Gene Med., 5:609-617, 2003)。

【0020】

(3) 組換えウイルスの発現

1) 方法

組換えウイルスの発現を確認するために、MVA-HIV、vPE16 (HIV env 発現自己増殖型ワクチニアウイルス WR 株)、Ad5/F35-HIV を同量の 2 x SDS 緩衝液 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% グリセロール, 0.01% プロモフェノールブルー、10% β -メルカプトエタノール) に溶解した。10 分間煮沸した後、この溶液を 4-12% 勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後、Hybond ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) に転写し、マウス抗 HIV gp120 モノクローナル抗体 (hybridoma 902, AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institute of Health, MD) で gp160 を検出した。その後、affinity-purified horseradish peroxidase (HRP) ラベル抗マウス Ig (ICN Pharmaceuticals, Inc, OH) で処理し、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて X 線フィルムに感光した。

【0021】

2) 結果

MVA-HIV、vPE16、Ad5/F35-HIV の発現を in vitro で確認した。その結果を図 1 に示した。図 1 から分かるように、ウイルスを含む lysates では gp160 が検出されたが、293 細胞 lysates では検出されず、ウイルスベクターの感染によって HIV 遺伝子が発現していることが確認された。

【実施例 2】

【0022】

組換えウイルスの評価

(1) 方法

1) 実験動物と免疫方法

8 週齢のメス BALB/c マウスは Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan から購入し、12

時間ごとの昼夜サイクルが保たれている動物センターで飼育した。免疫方法は、図 2 に示したとおりである。複合型ワクチンは、0 週目、1 週目、2 週目に i.m. で PBS に溶解した 100g pCAG rev/env あるいは pCAG empty DNA (pCAG rev/env から rev/env を除いたプラスミド) を投与、3 週目に 10^{10} particles Ad5/F35-GFP を i.m. 投与、Ad5/F35-HIV を i.m. あるいは i.d. で投与した。ウイルスベクターのみの投与群は、PBS に溶解した 10^{10} particles Ad5/F35-GFP あるいは Ad5/F35-HIV を i.m.、i.p.、s.c. あるいは i.d. で投与した。

【0023】

2) テトラマーアッセイ

テトラマーアッセイは最終免疫から 1 週間後に行った。PE 結合 H-2Dd/p18 テトラマー (RGPGRAFVTI) は AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institute of Health, MD から購入した。テトラマーアッセイの方法は、Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 13:1571-1581, 2002 に示されている方法を用いた。単離したリンパ球は PBS に溶解した 4% マウス血清で 4℃ 30 分間ブロッキングし、その後、 $0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells 抗マウス CD8-FITC 抗体 (Ly-2, PharMingen) を用いて 4℃ 30 分間染色した。staining buffer (3% FCS, 0.1% NaN_3 in PBS) で 2 回洗浄した後、テトラマー溶液とともに 37℃ で 15 分間インキュベートし、その後フローサイトメーター (Becton Dickinson) で分析を行った。

【0024】

3) 細胞質内サイトカイン染色 (ICCS) アッセイ

IFN-産生 CD8^+ T 細胞の検出は、the manufacturer's instructions (Cytofix/CytoPerm Plus kit, PharMingen, San Diego, CA) に示されている方法で行った。マウスの脾臓からリンパ球を単離し、それを HIV V3 ペプチド (NNTRKRIQRGPGRAFVTIGKIGN) 10 g/ml とともに 37℃ で 24 時間インキュベートした。インキュベーション終了 2 時間前に GolgiPlug 1g/ml を加えた。インキュベーション終了後、細胞は staining buffer (3% FCS, 0.1% NaN_3 in PBS) で洗浄し、4% マウス血清でブロッキングした後、phycoerythrin (PE) ラベル抗マウス CD8 抗体 (Ly-2, PharMingen) で染色した。染色後、細胞を Cytofix/Cytoperm solution 250 l に溶解して 4℃ 20 分間静置した。Perm/Wash solution で洗浄した後、FITC ラベル抗マウス IFN-抗体 (PharMingen) を用いて 4℃ 30 分間染色し、フローサイトメーターで分析した。

【0025】

4) 組換えワクチニアウイルスの感染実験

ウイルス感染実験は、Belyakov, I. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:1709-1714, 1998 および Xin, K.-Q. et al., Hum. Gene Ther. 13:1571-1581, 2002 に示されている方法で行った。感染には HIV-1 IIIB env 遺伝子を発現する組換えワクチニアウイルス vPE16 (AIDS Reagent Program, NIH, MD; Cat. No. 362) を用いた。まず、本発明のキメラアデノウイルスベクター Ad5/F35-HIV 接種から 2 または 7 週間後のマウスに、 10^8 PFU の vPE16 を腹腔内投与で感染させた。感染後 6 日目にマウスから卵巣を摘出し、その卵巣細胞を超音波によってよくほぐした後、CV1 細胞のプレートにおける 10 倍希釈ごとの vPE16 のウイルス力価を調べた。感染した細胞はクリスタルバイオレットで染色し、おのおのの濃度におけるブラック数を計測した。

【0026】

5) データ解析

値はすべて平均±標準誤差 (S.E.) で示した。データは一元配置分散分析によって統計処理し、有意水準 5% で検定を行った。

【0027】

(2) 結果

1) アデノウイルスベクターの肝臓および腎臓に対する細胞毒性

マウスに 10^{11} particles (免疫時の 10 倍の濃度) の Ad5-LacZ と Ad5/F35-LacZ を、i.v. あるいは i.p. により投与した。投与後 6 日目に、Kitayama Rabesue Corp., Nagan

o, Japan に依頼し、これらの肝臓および腎臓に対する毒性試験を行った。図 3 の結果から見て取れるように、Ad5-LacZ 投与群は Ad5/F35-LacZ 投与群に比べて i.v. と i.p. でそれぞれ 10 倍、2 倍高い GOT、GPT を示した。腎臓に対する毒性は、Ad5-LacZ 投与群、Ad5/F35-LacZ 投与群において大きな差はなかった。

【0028】

2) 免疫反応のタイムコース

0 日目に Ad5/F35-HIV (10^{10} particles/mouse) を i.m.、i.d.、i.p. あるいは s.c. でマウスに投与し、ネガティブコントロールとして Ad5/F35-GFP (10^{10} particles/mouse) を i.m. 投与した。免疫したマウスにおける HIV 特異的免疫反応は、テトラマーおよび細胞質内サイトカイン染色 (ICCS) アッセイで検出した。図 4 に示すように、免疫反応の強さは、全ての投与方法において 14 日目に最大になりそれ以降は徐々に減少した。図 4 における大きさ (i.m. > i.d. > i.p. > s.c.) は、HIV 特異的な細胞性免疫反応の強さを反映しており、ICCS アッセイにおいても同様の結果が得られた (図 5)。バックグラウンド (Ad5/F35-GFP 投与群) 値は、テトラマーアッセイでは 0.15% 以下、ICCS アッセイでは 0.13% 以下であった。したがって以降の免疫には i.m.、i.d. 投与方法を用いることにした。

【0029】

3) pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV 免疫による長期性の細胞性免疫の惹起

HIV 特異的な細胞性免疫を検出するために 2 種類のアッセイ法 (テトラマー染色、細胞質内サイトカイン染色 (ICCS)) を行った。最終免疫後 2 週間目において、i.d. あるいは i.m. による Ad5/F35-HIV 投与群は、DNA ワクチン (pCAGrev/env) 投与群の 6 倍以上の IFN-産生 HIV 特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導した (図 6)。また、Ad5/F35-HIV は、HIV ワクチンの有望な候補である MVA-HIV、vPE16 よりも約 2 倍強い細胞性免疫を惹起し、さらに、pCAGrev/env と Ad5/F35-HIV による複合型ワクチンは、Ad5/F35-HIV のみ投与した場合と比較して 3 倍以上強い免疫応答を誘導した。これらの結果は ICCS アッセイでも同様に観察された (図 7)。また、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV 免疫を行ったマウスにさらに追加免疫を行っても、HIV 特異的な細胞性免疫応答はほとんど増加しなかったことから (i.d. と i.p. 投与、それぞれ 18%、19% から 20%、21% に増加) (図 8)、このワクチンはほぼ最高値に近い抗原特異的免疫反応を惹起させることが示唆された。

【0030】

Ad5/F35-HIV 投与によって誘導された免疫応答が実際に生体防御に寄与するか確認するために、最終免疫後 2 週間目のマウスに、HIV env 遺伝子を発現するワクチニアウイルス vPE16 を腹腔内感染させた。その結果、図 9 に示すように、Ad5/F35-HIV 投与群、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV 投与群ともに、ウイルスの感染を完全に防御し、このワクチンが生体防御に寄与していることが明らかになった。

次に、このワクチンが長期的な免疫応答を生み出すことができるかどうかについて調べた。その結果、最終免疫後 7 週間目においても、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV ワクチン接種した群において高いレベルの HIV 特異的な細胞性免疫応答が確認された (i.d. と i.m. 免疫でそれぞれ 8% と 9%) (図 10)。また、最終免疫後 7 週間目に vPE16 の感染実験を行ったが、pCAGrev/env/Ad5/F35-HIV ワクチンの投与によってウイルス感染は完全に防御され (図 11)、このワクチンが長期的な免疫応答を誘導できることが明らかになった。

また、図 12 に示すように、本発明の Ad5/F35-HIV は、MVA-HIV の 1000 倍ものウイルス力価を有する。

【産業上の利用可能性】

【0031】

本発明により、HIV env 遺伝子を発現するキメラ Ad5/F35-HIV ベクターが、強い抗原特異的細胞性免疫反応を惹起することを明らかにされた。これは現在 HIV ワクチンとして最有力視されている MVA ベクター以上に強い免疫反応である。さらに、マウスモデルにおいて、キメラ Ad5/F35-HIV ベクターと DNA ワクチンを組み合わせた複合型ワクチンが

、ウイルス感染に対する長期的な防御反応が誘導することも判明した。これらの結果は、AIDS の蔓延を抑制する画期的な HIVワクチンの開発の可能性を示唆していると言える。

抗原特異的細胞性免疫および中和抗体は、HIVの感染防御において大変重要である。DNAワクチンと本発明の HIV env 遺伝子を発現するキメラ Ad5/F35-HIV ベクターを組み合わせて用いることにより、特異的な抗体に対するほぼ最高値の細胞性免疫が誘導されることが分かった。さらに、この複合型ワクチンは長期的な防御性免疫応答を誘導できることも明らかになった。本発明のキメラ Ad5/F35-HIV ベクターは、従来の Ad5 ベクターを臨床治療に用いる際の最大の障壁となっている肝臓への副作用が少なく、ヒト樹状細胞に高い親和性を持っており、このことからヒトでの臨床試験におけるめざましい成果が期待できる。

細胞性および体液性免疫を誘導できる安全で有効性の高い、かつ安価なワクチンは HIV の拡大を抑制するために大変重要である。そこで、本発明のキメラ Ad5/F35-HIV ベクターは、AIDSの蔓延を抑制する大きな可能性を秘めた次世代のワクチンとなりうるものである。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1は、組換えウイルス MVA-HIV、vPE16、Ad5/F35-HIVを電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、マウス抗 HIV gp120 モノクローナル抗体を用いてX線フィルムに感光させ、HIV gp 160 蛋白質を確認した図を示す。

【図2】図2は、各種組換えウイルスをマウスで免疫したときの免疫スケジュールを示す。

【図3】図3は、Ad5 ベクター (Ad5-LacZ) および Ad5/F35 ベクター (Ad5/F35-LacZ) の細胞毒性を調べた結果を示す。免疫時の 10 倍の量である 10^{11} particles の組換え Ad5 ベクター (Ad5-LacZ) または Ad5/F35 ベクター (Ad5/F35-LacZ) を BAL B/c マウスの静脈または腹腔内に投与した ($n = 3$) 時の、肝臓および腎臓に対する細胞毒性は、マウスの血清を用いて投与後 6 日目に測定した。

【図4】図4は、組換えウイルス Ad5/F35-HIV をマウスに免疫した時の HIV 特異的免疫反応を経時的にテトラマーアッセイにより測定した結果を示す。0 日目に 10^{10} particles の Ad5/F35-HIV ベクターを様々な経路で投与した。図中の時間における HIV 特異的 CD8⁺ 細胞の割合を検出した。値は 4 または 5 匹のマウスの平均値である。図中、i.m. は筋肉、i.d. は皮内、i.p. は腹腔内、s.c. は皮下投与を示し、Ad 5/F35-GFP はGFPタンパクを発現する Ad5/F35-GFP ベクターであり、ネガティブコントロールとして用いた。

【図5】図5は、組換えウイルス Ad5/F35-HIV をマウスに免疫した時の HIV 特異的免疫反応を経時的に ICCS アッセイにより測定した結果を示す。0 日目に 10^{10} particles の Ad5/F35-HIV ベクターを様々な経路で投与した。図中の時間における HIV 特異的 CD8⁺ 細胞の割合を検出した。値は 4 または 5 匹のマウスの平均値である。図中、i.m. は筋肉、i.d. は皮内、i.p. は腹腔内、s.c. は皮下投与を示し、Ad5/F35-GFP はGFPタンパクを発現する Ad5/F35-GFP ベクターであり、ネガティブコントロールとして用いた。

【図6】本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫、それに続くウイルス感染後の免疫応答を示す。DNAワクチン (pCAGrev/env)、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV) (10^{10} particles/mouse) を、どちらかあるいは両方を i.m. あるいは i.d. でマウスに投与した。最終免疫後2週間目に HIV特異的免疫反応をテトラマーアッセイによる検出した。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は10匹のマウスの平均値を示す。

【図7】本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫、それに続くウイルス感染後の免疫応答を示す。DNAワクチン (pCAGrev/env)、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV) (10^{10} particles/mouse) を、どちらかあるいは両方を i.m. あるいは i.d. でマウスに投与した。最終免疫後2週間目に HIV特異的免疫反応を ICCSにより検出した。スポットはそれぞれ

れのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は10匹のマウスの平均値を示す。

【図 8】本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫、それに続くウイルス感染後の免疫応答を示す。DNAワクチン (pCAGrev/env)、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV) (10^{10} particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m. あるいは i.d. でマウスに投与した。図2に示したスケジュールで免疫し、1週間後に 10^8 pfu/mouse の vPE16 ワクチニアウイルスを i.p. で投与したときの免疫応答を示す。値は6-10匹のマウスの平均値で示した。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は10匹のマウスの平均値を示す。

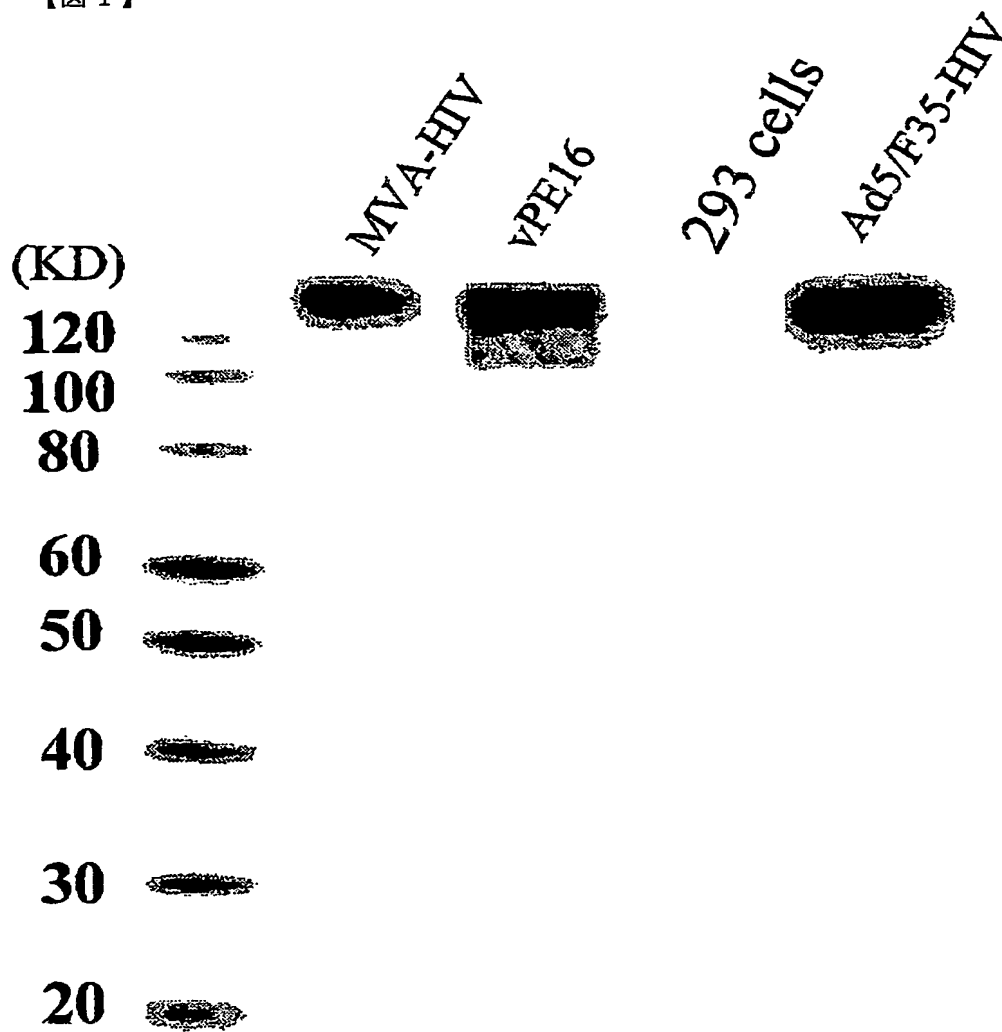
【図 9】本発明の Ad5/F35-HIV で最終免疫、それに続くウイルス感染後の免疫応答。DNAワクチン (pCAGrev/env)、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV) (10^{10} particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m. あるいは i.d. でマウスに投与した。感染させたマウスの卵巣におけるワクチニアウイルス力価を示す。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は10匹のマウスの平均値を示す。

【図 10】図 10 は、最終免疫後7週間目の免疫応答と感染実験の結果を示す。DNA ワクチン (pCAGrev/env)、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV) (10^{10} particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m. あるいは i.d. でマウスに投与して免疫を行った。最終免疫後 7 週間目にテトラマーアッセイによって検出した HIV-特異的免疫反応の測定結果を示す。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は 10 匹のマウスの平均値を示す。

【図 11】図 11 は、最終免疫後7週間目の免疫応答と感染実験の結果を示す。DNA ワクチン (pCAGrev/env)、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV) (10^{10} particles/mouse)を、どちらかあるいは両方を i.m. あるいは i.d. でマウスに投与して免疫を行った。最終免疫後 7 週間目の感染させたマウス卵巣におけるワクチニアウイルス力価を示す。スポットはそれぞれのマウスのウイルス力価を示しており、横棒は10匹のマウスの平均値を示す。

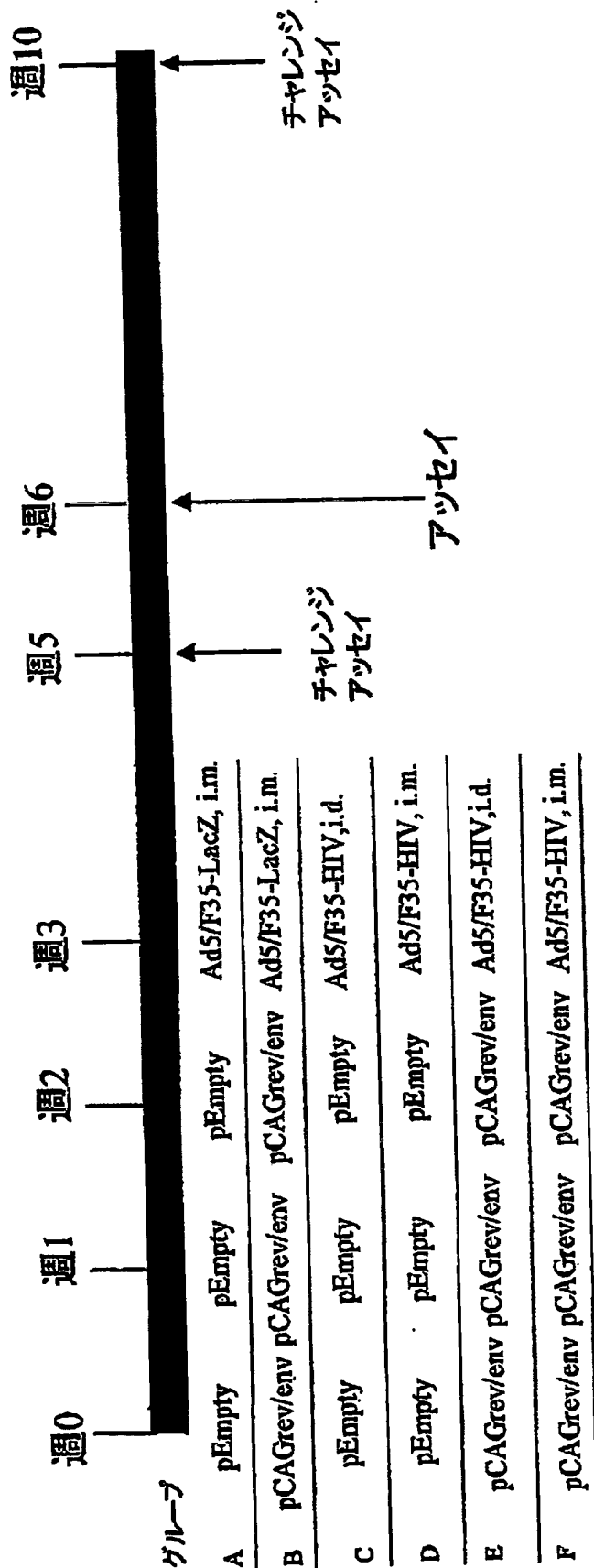
【図 12】図 12 は、ウイルスベクター (Ad5/F35-HIV、MVA-HIV、rPE16) の力価を示し、20個の15cmディッシュから得られたウイルスの力価を示した。

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】

免疫及びアッセイスケジュール



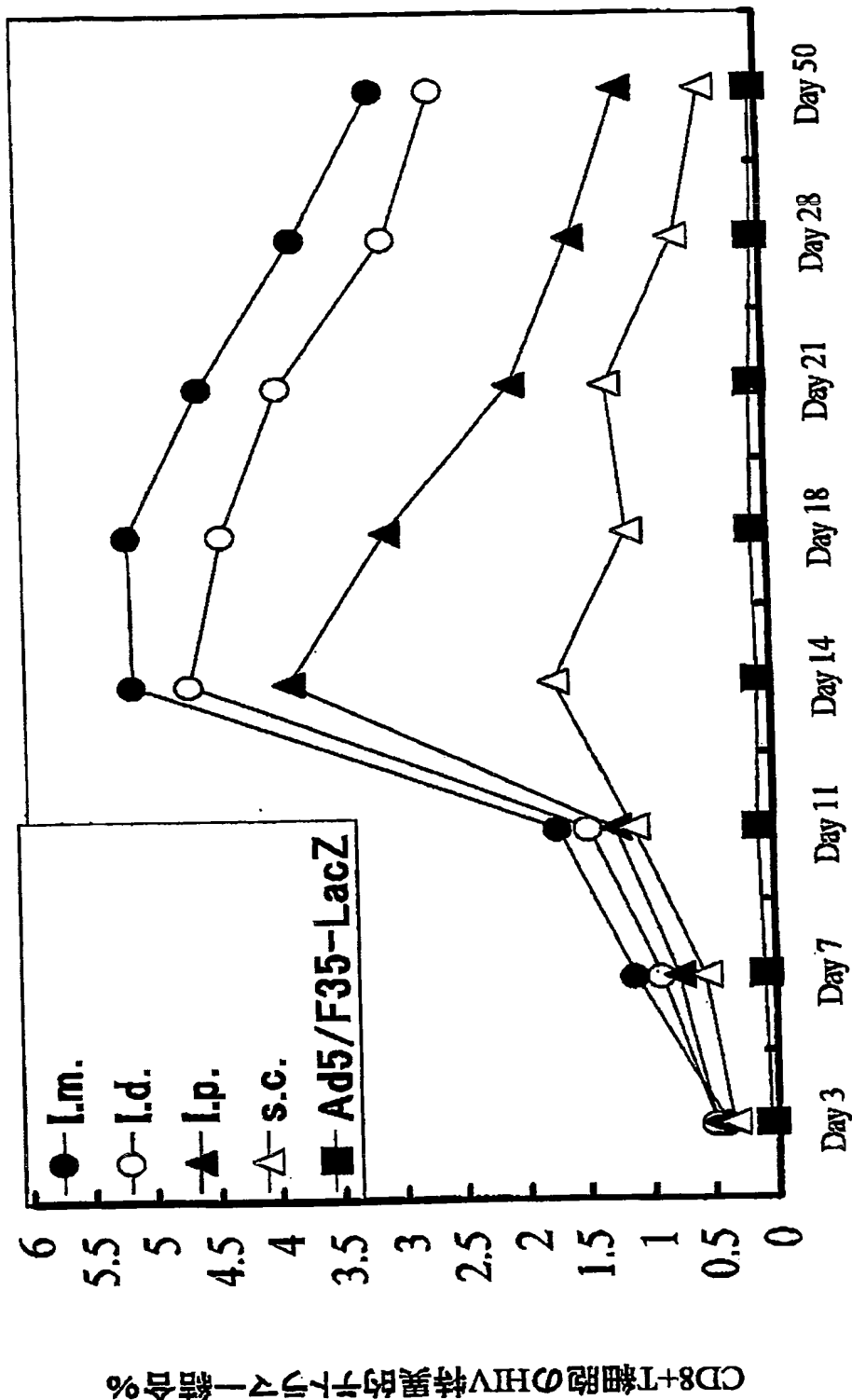
【図 3】

BALB/cマウスにおける細胞毒性

	臨床テスト	スタンダード	Ad5-lacZ		Ad5/F35-lacZ	
			静脈投与	腹内投与	静脈投与	腹内投与
肝臓機能	GOT	10-40	1099	100	113	56
	GPT	6-40	1504	53	123	27
腎臓機能	尿酸	8-20	23	23	24	26
	CHO	0.6-1.3	0.43	0.42	0.43	0.43
	NA	135-147	150	151	151	150
	K	3.5-5.1	5.3	6.0	5.6	6.0

【図4】

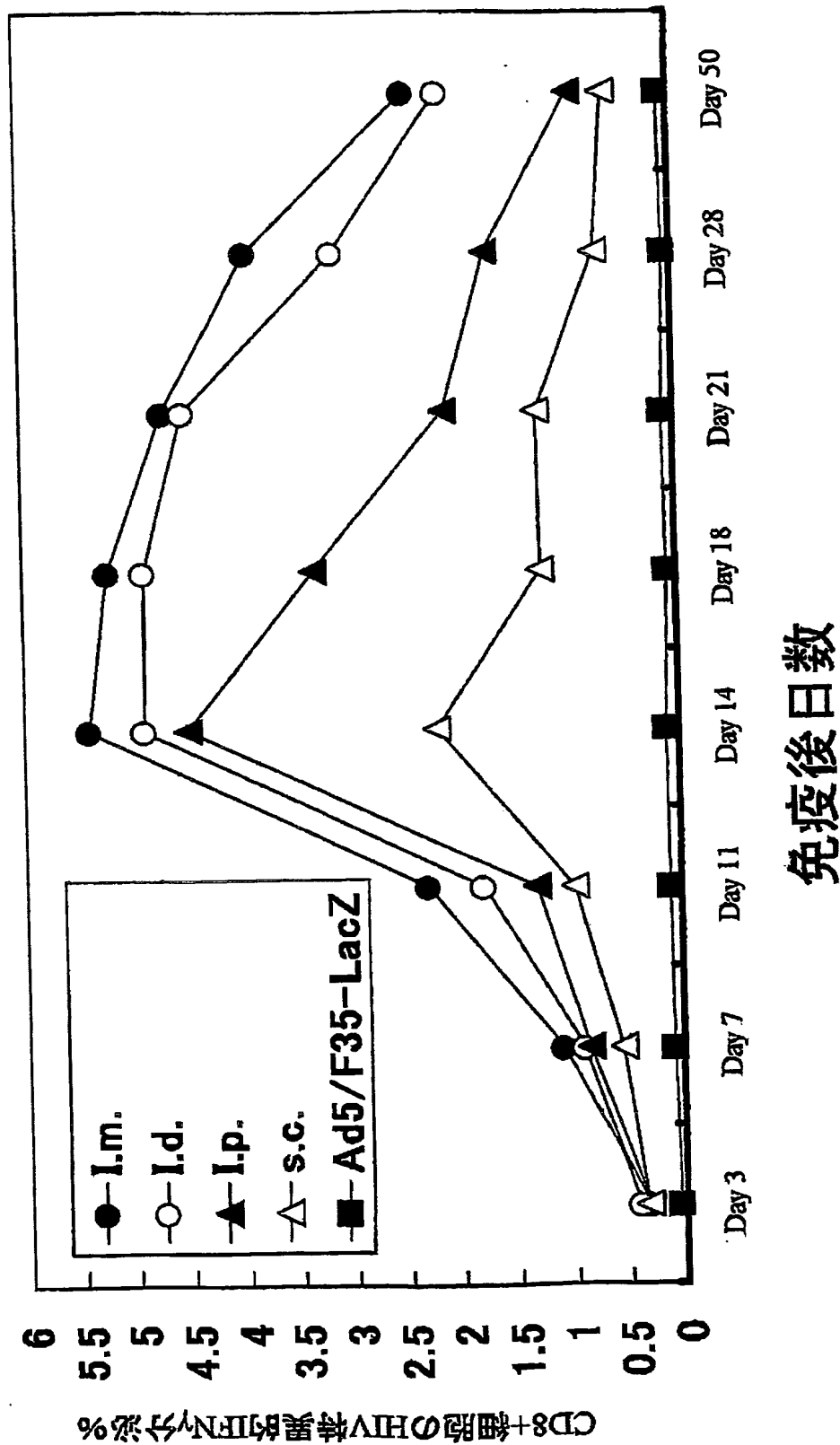
テトラマーアッセイによる経時的免疫反応



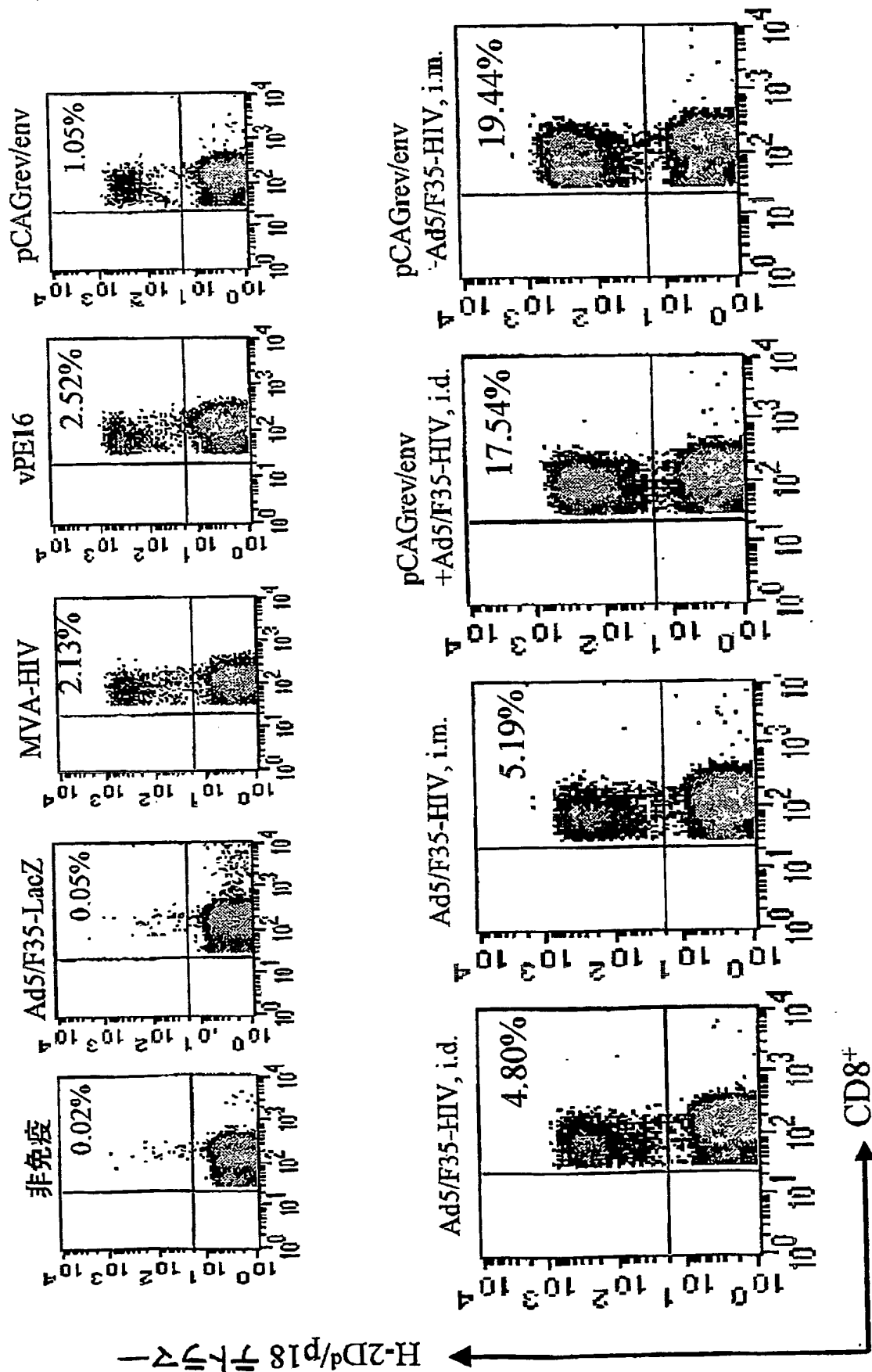
免疫後日数

ICCSアッセイによる経時的免疫反応

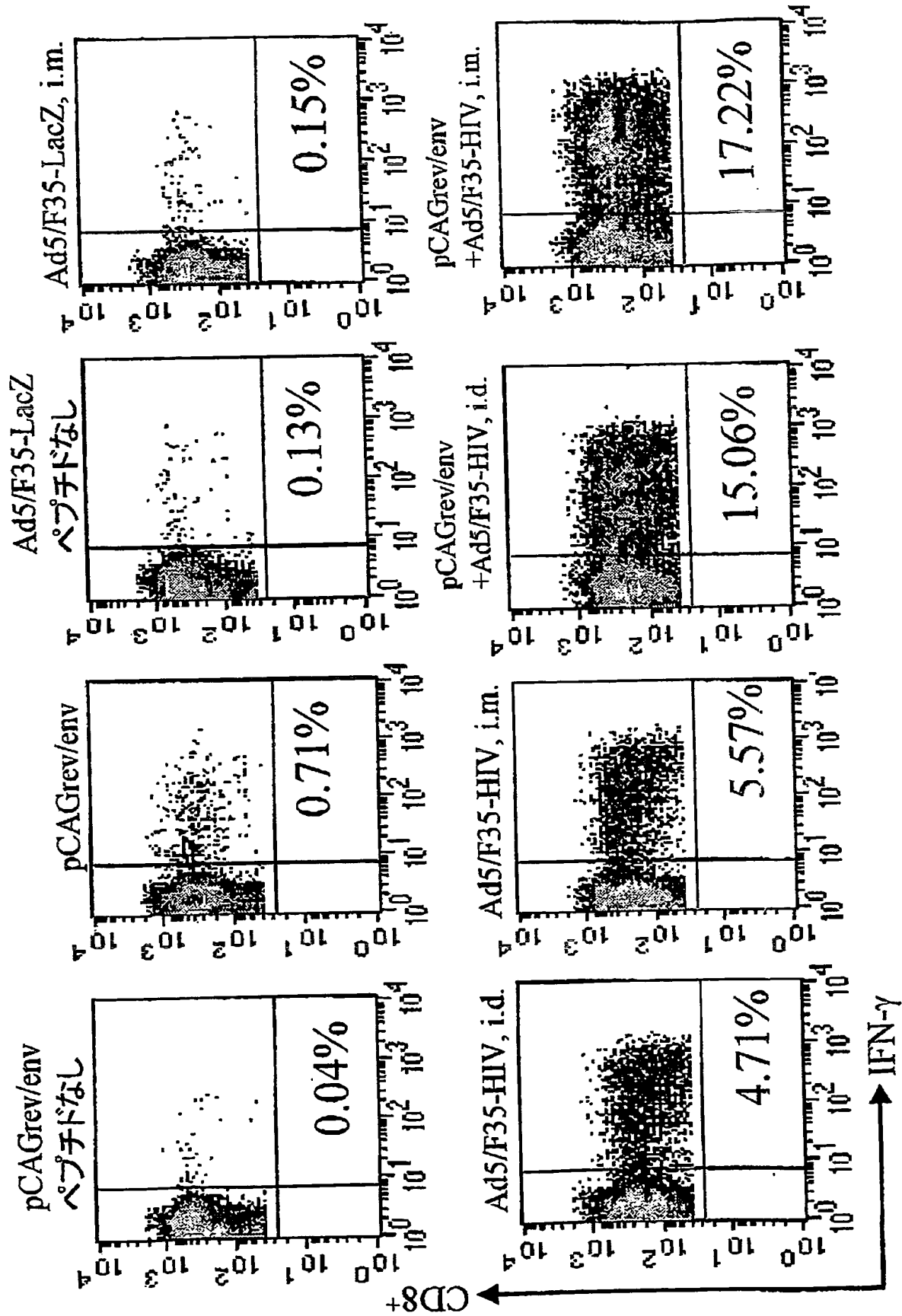
【図5】



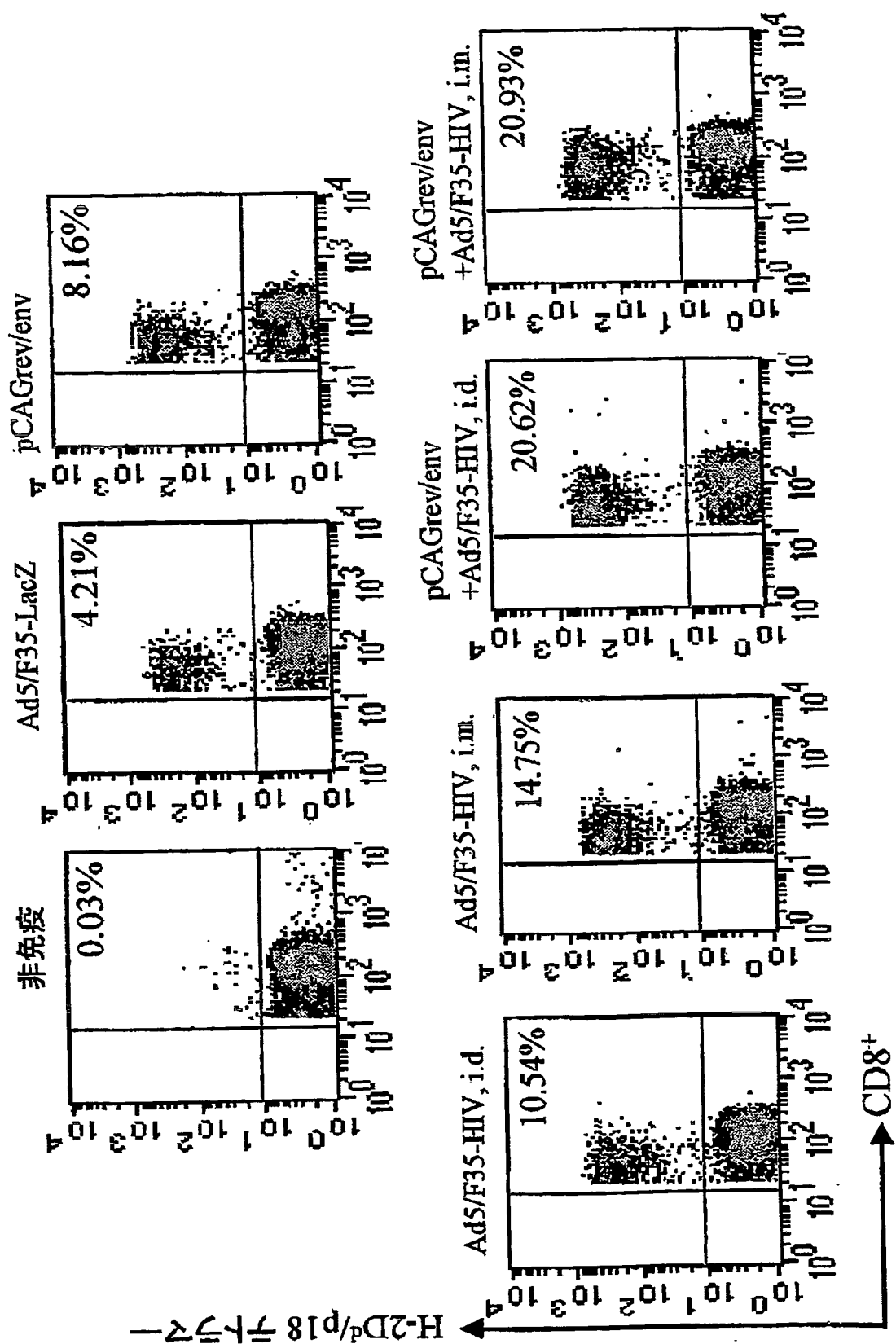
【図 6】



【図7】

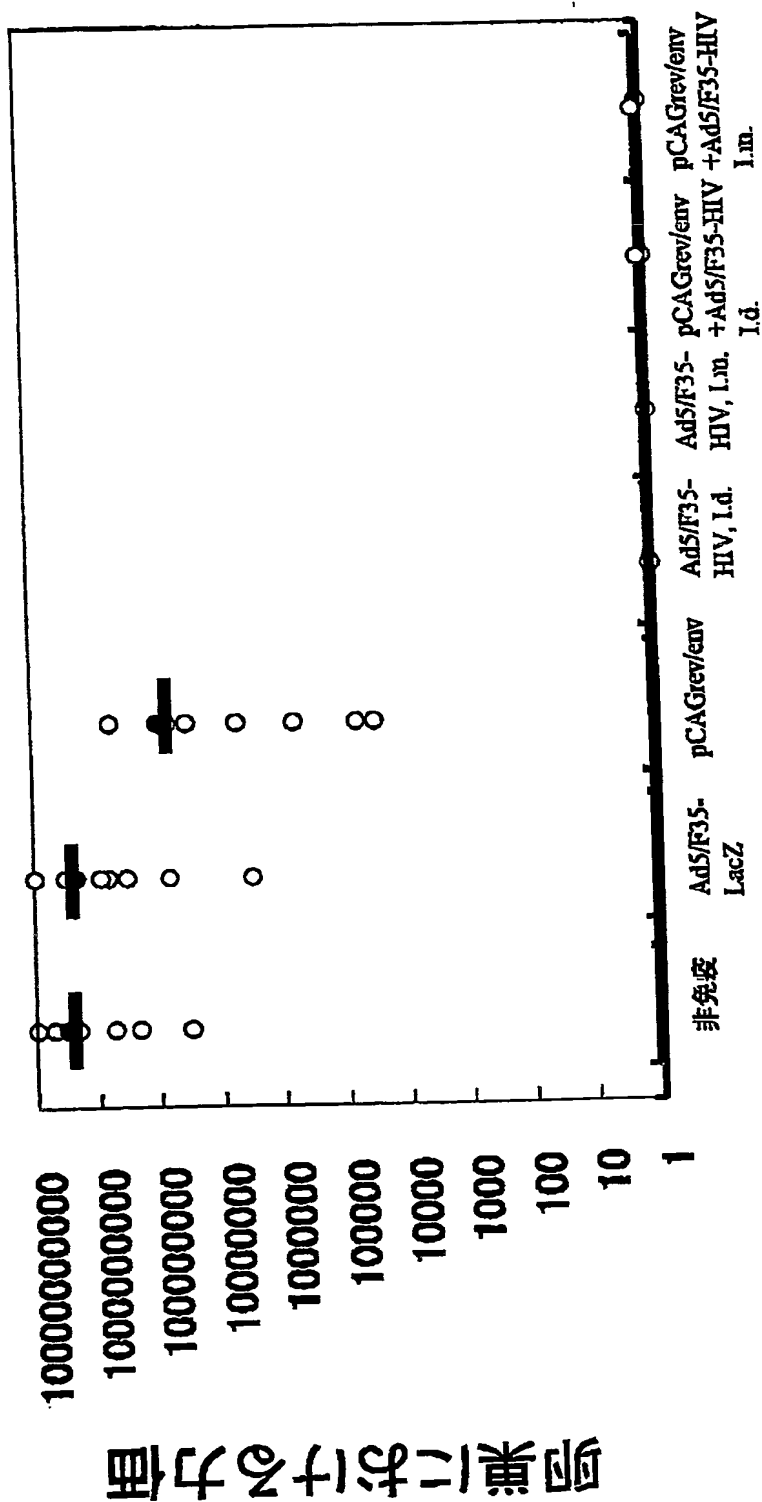


【図 8】

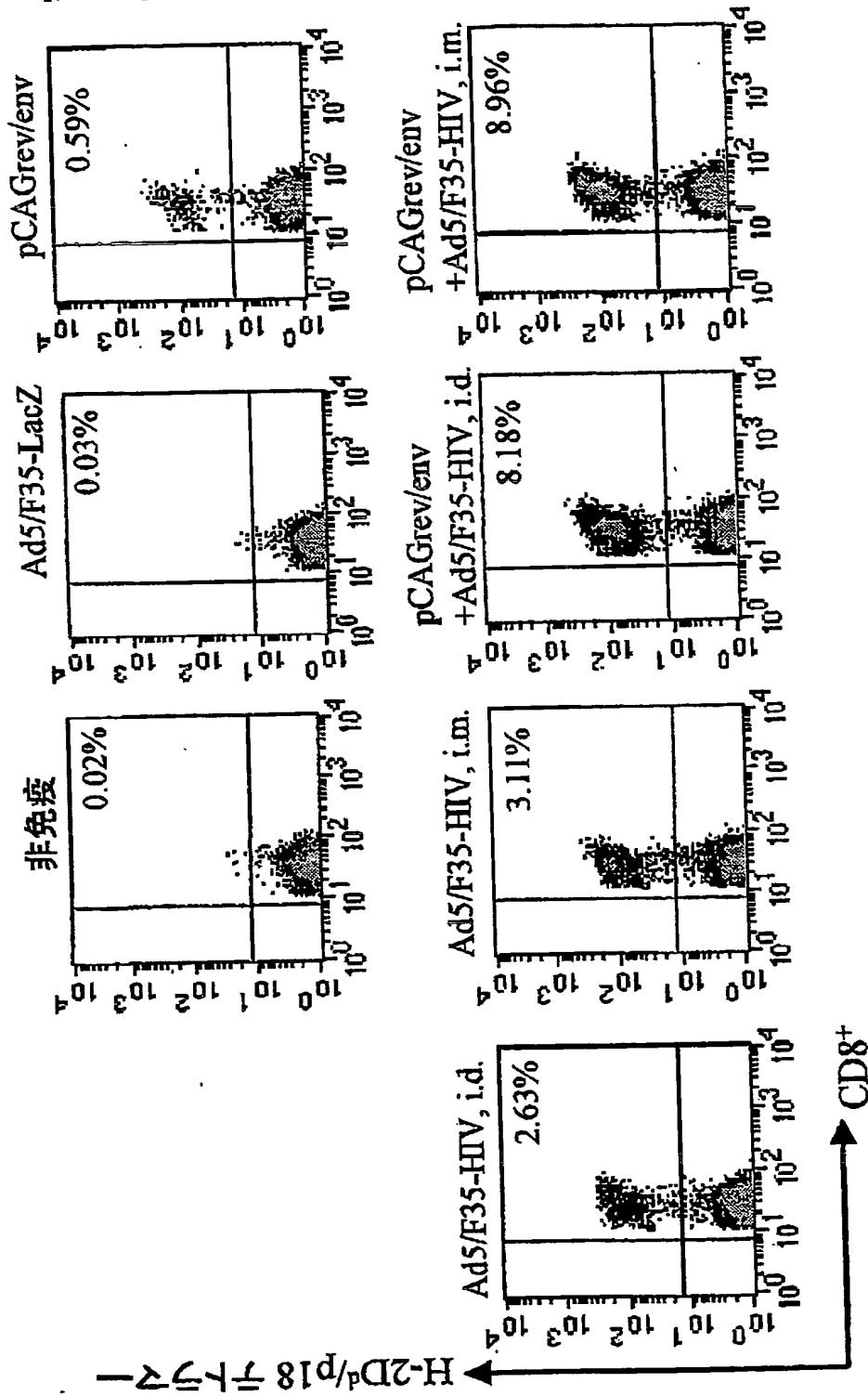


最終免疫後2週間目のチャレンジ

【図9】

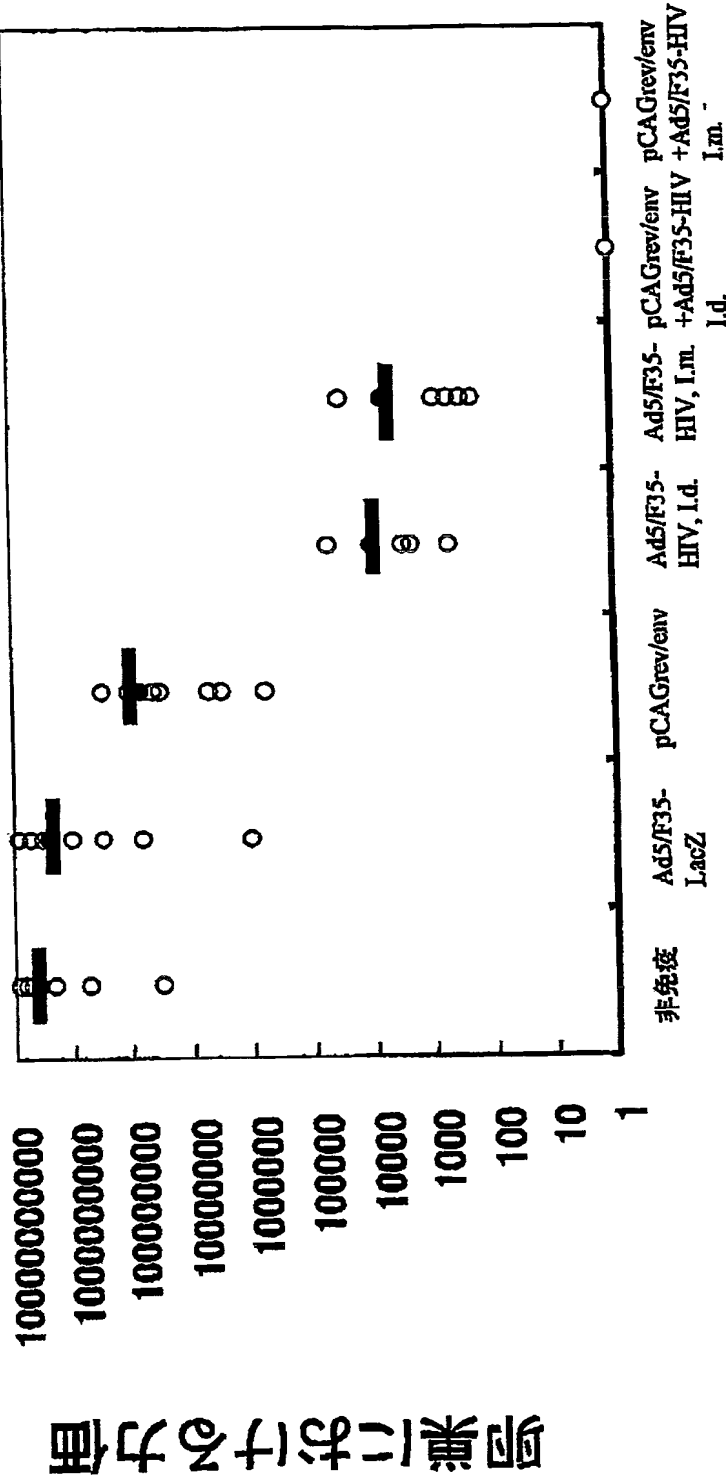


【図10】



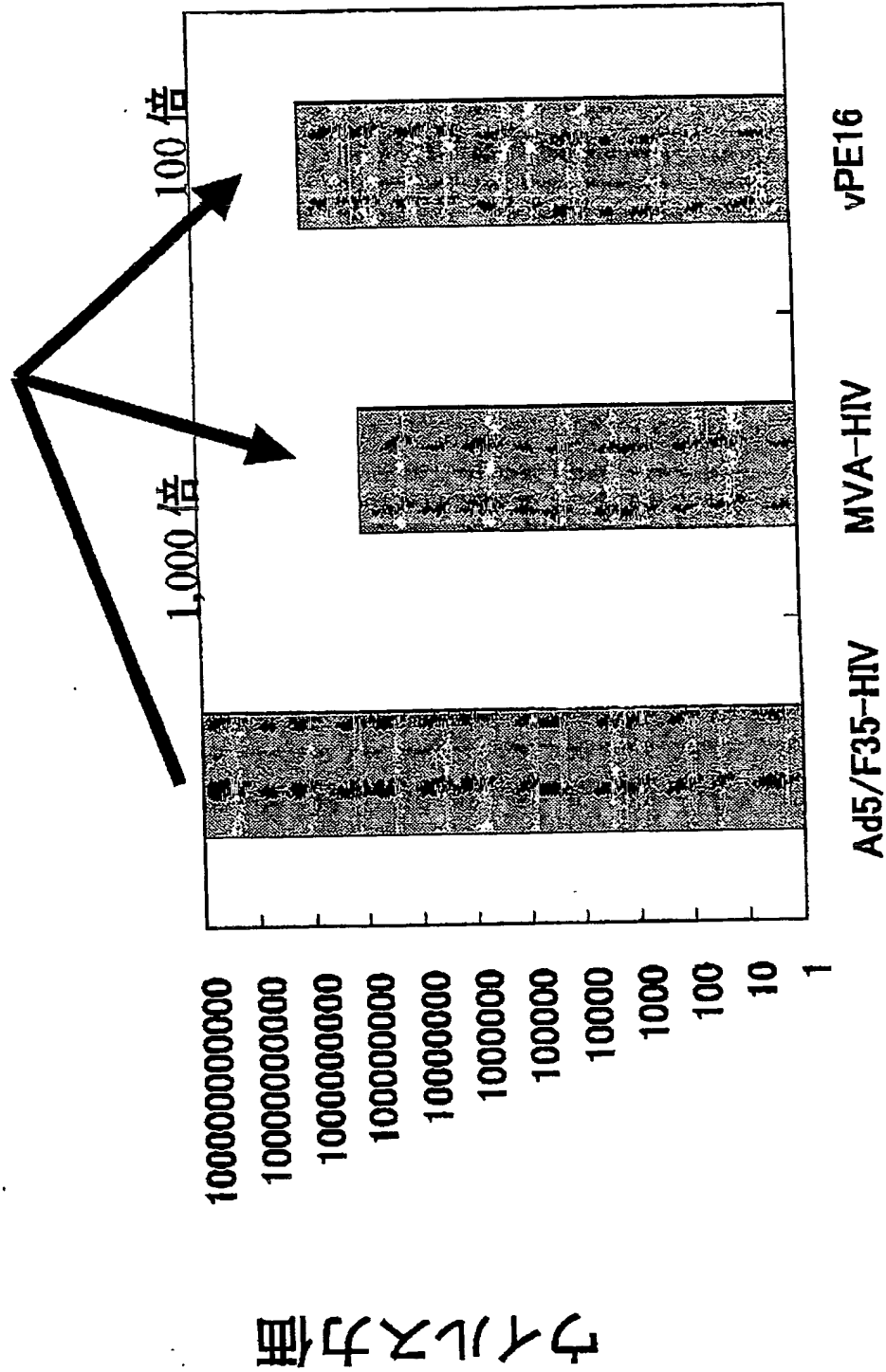
最終免疫後7週間目のチャレンジ

【図11】



【図 12】

15cm Ⅲ x20からのウイルスカ価



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 肝臓に対する毒性が軽減された新たな HIV 感染防御用のアデノウイルスベクターを提供することを課題とする。

【解決手段】 非増殖型 5 型アデノウイルスに、ヒト免疫不全ウイルスのエンベロープ蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子が発現可能なように組み込まれており、かつ当該 5 型アデノウイルスのファイバー蛋白をコードする遺伝子が 35 型アデノウイルスのファイバー蛋白もしくはそれと同様の機能を有するその変異体をコードする遺伝子に発現可能なように置換されているキメラ 5 型/35 型アデノウイルスベクターは、肝臓への毒性が軽減され、かつ非常に強い HIV 特異的細胞性免疫応答を惹起することができ、HIV 感染防御用の医薬として極めて有効である。

【選択図】 なし

特願 2003-399016

出願人履歴情報

識別番号

[501069599]

1. 変更年月日

2002年 3月22日

[変更理由]

名称変更

住所

大阪府大阪市中央区内本町1-2-5 YSKビル6階

氏名

株式会社プライミューン

特願 2 0 0 3 - 3 9 9 0 1 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 2 0 7 3 6 9 5]

1. 変更年月日

1 9 9 2 年 3 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市総曲輪 1 丁目 6 番 2 1

氏 名

日本医薬品工業株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017375

International filing date: 24 November 2004 (24.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-399016
Filing date: 28 November 2003 (28.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.